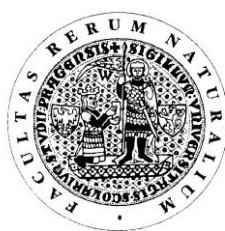


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Kamila Pultarová

REFRAKTOMETRICKÁ STUDIE LIPOPROTEINU O NÍZKÉ HUSTOTĚ (LDL)

Refractometric study of low density lipoprotein (LDL)

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Eva Tvrzická, CSc.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....

Podpis

Abstrakt

Zvýšená koncentrace lipoproteinů o nízké hustotě (LDL) v krevní plasmě je charakteristická pro zvýšené riziko kardiovaskulárního onemocnění. V současné době je předmětem zájmu rozdělení velikosti částic tohoto lipoproteinu; nejvyšší riziko představují tzv. malé densní LDL. Cílem práce byla příprava pro stanovení velikosti částic metodou gelové filtrace s detekcí ohybu laserového paprsku; tato metoda vyžaduje znalost závislosti indexu lomu na koncentraci částic.

Lipoproteiny LDL byly separovány pomocí ultracentrifugy a koncentrační závislosti byly určeny refraktometricky. Z testovaných funkcí nejlépe vyhovovala závislost lineární a exponenciální. Tato závislost je charakteristická pro každý biologický vzorek, a proto musí být určena individuálně.

Abstract

Raised concentrations of low density lipoproteins in blood plasma are characteristic for increased risk of cardiovascular diseases. At present, distribution of LDL particle size is the topic of interest; small dense LDL represent the highest risk. The aim of our study was the dependence of refractometric index on particle concentration; this dependence is necessary for size determination by the method of size exclusion chromatography with laser light scattering detection.

Lipoproteins LDL were separated by ultracentrifugation and concentration dependences were determined refractometrically. Linear and exponential dependences were the most convenient of all functions tested. Dependence dn/dc is characteristic for each biological sample and should be determined individually.

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratek.....	7
1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1 Refraktometrie.....	10
2.1.1 Princip metody.....	10
2.1.2 Index lomu.....	11
2.1.2.1 Závislost indexu lomu na teplotě.....	12
2.1.2.2. Závislost indexu lomu na vlnové délce použitého záření.....	12
2.1.2.3 Index lomu v závislosti na hustotě látky.....	13
2.1.3 Abbeho refraktometr.....	13
2.1.4 Aplikace refraktometrie v klinické biochemii a jiné použití.....	16
2.2 Lipoproteiny.....	18
2.2.1 Charakteristika a složení lipoproteinů.....	18
2.2.2 Skupiny lipoproteinů.....	19
2.2.2.1 Chylomikrony.....	20
2.2.2.2 Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL)	20
2.2.2.3 Lipoproteiny o střední hustotě (IDL)	21
2.2.2.4 Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL)	21
2.2.2.5 Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL).....	22
2.2.3 Separace lipoproteinů.....	23
2.2.3.1 Ultracentrifugace.....	23
2.2.3.2 Elektroforéza.....	23
2.3 Stanovení cholesterolu, triacylglycerolů a celkové bílkoviny.....	24
2.3.1 Stanovení cholesterolu.....	24
2.3.1.1 Princip enzymatického fotometrického stanovení cholesterolu.....	24
2.3.2 Stanovení triacylglycerolů (TAG).....	25
2.3.2.1 Princip enzymatického fotometrického stanovení TAG.....	25

2.3.3 Stanovení celkové bílkoviny (CB).....	26
2.3.3.1 Biuretová metoda.....	26
2.3.3.1.1 Princip biuretové metody.....	26
2.3.3.2 Kjeldahlova metoda.....	26
3. Cíl práce.....	27
4. Experimentální část.....	28
4.1 Použité chemikálie.....	28
4.2 Použité přístroje.....	28
4.3 Pracovní postup.....	29
4.3.1 Příprava vzorků.....	29
4.3.2 Měření indexu lomu.....	30
4.4 Výsledky.....	31
4.4.1 Vzorek J “ředěný”	32
4.4.2 Vzorek B “ředěný”	33
4.4.3 Vzorek B “zahuštěný”	34
4.4.4 Vzorek J+B “ředěný”	35
4.4.5 Vzorek T “ředěný”	36
4.4.6 Vzorek T “zahuštěný”	38
4.4.7 Vzorek T-nový “zahuštěný”	39
4.4.8 Vzorek K “zahuštěný”	40
4.4.9 Vzorek S “zahuštěný”	42
4.4.10 Hodnoty korelačních koeficientů.....	44
4.5 Diskuze.....	45
4.6 Závěr.....	46
Literatura.....	47

Seznam použitých symbolů a zkratek

ACAT	acyl – cholesterol – acyltransferasa
ADP	adenosindifosfát
apo	apolipoprotein
ATP	adenosintrifosfát
c	rychlost záření
CB	celková bílkovina
CE	cholesterolester
CoA	koenzym A
CP	“coated pits”
CV	“coated vesicle”
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
end.	endosom
ER	endoplasmatické retikulum
FFA	volné mastné kyseliny
GK	glycerolkinasa
GPO	glycerol – 3 - fosfát oxidasa
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IDL	lipoproteiny o střední hustotě
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LLSD	laser light – scattering detection
LPL	lipoproteinová lipasa
M	molekulová hmotnost
n	index lomu
N	absolutní index lomu
ñ	medián indexů lomu
NADH	nikotinamidadenin dinukleotid
POD	peroxidasa
r	specifická refrakce

R	molární refrakce
RPM	označení jednotky otáčky/minuta
s	směrodatná odchylka
Sf	flotační konstanta
TAG	triacylglyceroly
VHDL	lipoproteiny o velmi vysoké hustotě
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
ρ	hustota
φ	objemový zlomek
v	rychlost světla v hmotném prostředí

1. Úvod

Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) sestávají z dvou populací částic. Frakce obsahující větší částice s průměrem 25-30 nm se nazývá lipoproteiny o střední hustotě (IDL), nebo LDL₁. Její relativní hustota je 1,006 - 1,019. Frakce menších částic (20-25 nm) jsou vlastní LDL (LDL₂), relativní hustota je 1,019 - 1,065. Tu lze ještě dále dělit na čtyři subfrakce: LDL-I o průměru 27,5-26,0 nm, relativní hustoty 1,025 - 1,034, LDL-II o průměru 26,0-25,5 nm a relativní hustoty 1,034 - 1,044, LDL-III s průměrem 25,5-24,2 nm a hustotou 1,038 - 1,050, a konečně LDL-IV o průměru 24,2-21,8 nm a hustotě 1,048 - 1,065. Zastoupení jednotlivých subfrakcí vypovídá více o metabolickém stavu organismu než samotná koncentrace lipoproteinu LDL. Důležitá je zvláště detekce subfrakce LDL-IV (tzv. „malých densních“ LDL).

Lipoprotein LDL je znám jako aterogenní a stanovení koncentrace jeho cholesterolu a apolipoproteinu B je nedílnou součástí vyšetření kardiovaskulárního rizika. S rostoucími požadavky na detailnější analýzy vyvstává i požadavek stanovení jednotlivých subfrakcí LDL, popřípadě určení velikosti částic. To lze v zásadě provést třemi alternativními metodami.

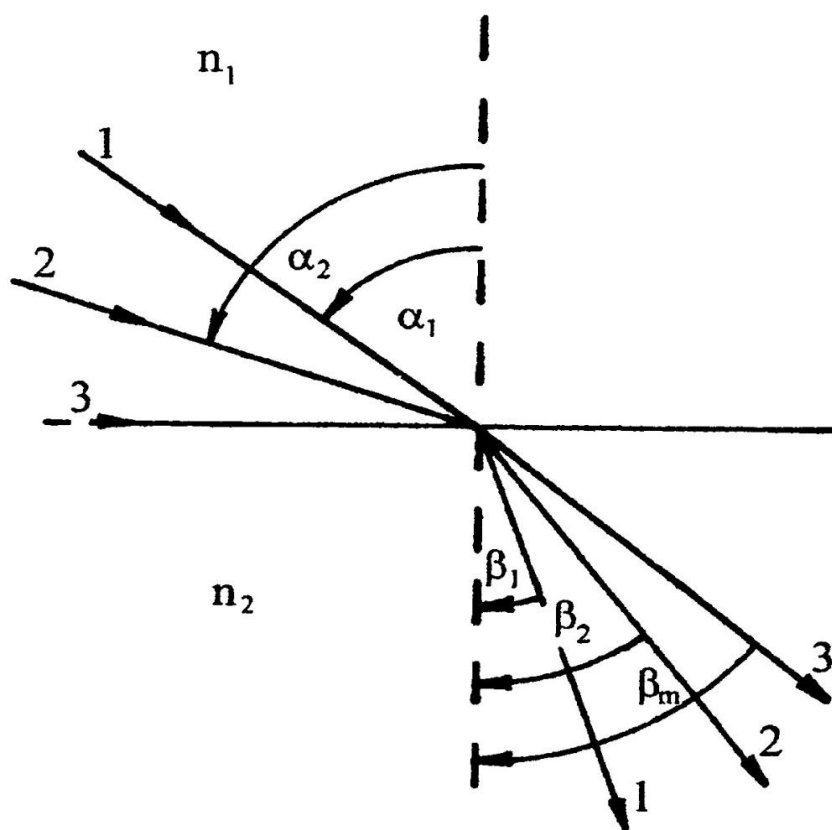
Nejnáročnějším způsobem je postupná separace jednotlivých subfrakcí pomocí ultracentrifugy s následným stanovením lipidové a proteinové složky. Práce je však časově příliš náročná (separace série vzorků trvá týden). Elektroforéza na gradientu polyakrylamidu s použitím komerčně dodávaných setů je svým provedením poměrně snadná, ale finančně značně náročná. Provádí se přímo z plasmy bez nutnosti předchozí separace ultracentrifugou. Metoda určí zastoupení jednotlivých subfrakcí, zatím je využívána pouze pro výzkumné účely. Třetí alternativou je gelová filtrace s využitím detektoru, který detekuje ohyb laserového paprsku na molekulách vzorku (Laser Light Scattering Detector) a umožňuje i výpočet molekulové váhy. K tomu je nutné znát závislost indexu lomu na koncentraci sledované látky. Změření této závislosti pro lipoproteiny o nízké hustotě odlišného chemického složení je cílem této práce.^{12, 21, 22, 23}

2. Teoretická část

2.1 Refraktometrie

2.1.1 Princip metody

Metoda je založena na měření indexu lomu látek, který je založen na určení kritického nebo-li mezního úhlu. Paprsky monochromatického záření 1 a 2 dopadají na rozhraní dvou prostředí, kde index lomu $n_1 < n_2$. Úhly α a β jsou úhly, které svírá paprsek světla s kolmicí dopadu. Zde α_1 a α_2 jsou úhly dopadu paprsků 1 a 2 a β_1 a β_2 jsou úhly lomu paprsků 1 a 2. Paprsek 3, lámající se pod mezním úhlem β_m (je největší úhel lomu za kterým se již žádné paprsky lomem nedostanou a tato část prostředí za ním je tedy temná), jde rovnoběžně s rozhráním, kde $\alpha_3 = 90^\circ$.^{1,2}



Obr. 1: Lom paprsků monochromatického záření na rozhraní dvou fází¹

2.1.2 Index lomu

Index lomu je fyzikální konstanta, která slouží k identifikaci látek, k posouzení jejich čistoty a k určení termodynamických vlastností stavu, v kterém se látka nachází. Někdy se také index lomu používá k ověření struktury organických látek.

Průchod světelného paprsku o známé vlnové délce je spojen s jistým odporem, jehož velikost závisí na hustotě prostředí (tj. koncentrace, kvantitativní a kvalitativní složení). Jestliže světelný paprsek přechází z jednoho prostředí do druhého, tak se na rozhraní těchto prostředí mění jeho rychlost a směr, tj. lom světelného paprsku závisí na poměru hustot obou prostředí. Například rychlost záření ve vakuu je zaokrouhleně $3 \cdot 10^{10} \text{ cm.s}^{-1}$ a rychlost záření ve vodě je zaokrouhleně $2,25 \cdot 10^{10} \text{ cm.s}^{-1}$. Index lomu je poměr rychlostí paprsku v prvním prostředí ku druhému prostředí.

$$n_{1,2} = \frac{c_1}{c_2}$$

Kde $n_{1,2}$ je index lomu, c_1 je rychlost záření v prvním prostředí a c_2 je rychlost záření v druhém prostředí.

Díky této veličině je možno z analytického hlediska charakterizovat neznámé prostředí, pakliže srovnáme neznámé prostředí s prostředím definovaným, kde známe průnikovou rychlost daného paprsku.

Jelikož rychlost průniku paprsku nelze v praxi dobře měřit, je měřena změna směru průchodu rozhraním mezi dvěma prostředími. Tudíž pro index lomu platí Snellův zákon lomu: ²

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1}$$

Kde n_1 je index lomu prvního prostředí a n_2 je index lomu druhého prostředí, α je úhel dopadu a β je úhel lomu.

Hodnota indexu lomu pro vzduch se rovná jedné, tudíž jestliže pozorujeme index lomu na rozhraní vzduch – měřená látka, můžeme použít vztah:

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

Index lomu je veličinou relativní, bylo tedy nutné určit přesně definované prostředí za standardní a tím je vakuum, kde je průniková rychlost rovná rychlosti světla $2,997925 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ a nulový odpor. Poměr rychlosti světla ve vakuu k rychlosti světla v daném měřeném prostředí se nazývá *absolutní index lomu*.

$$N = \frac{c}{v}$$

Kde N je absolutní index lomu, c je rychlost světla ve vakuu a v je rychlost světla v hmotném prostředí.

Index lomu látek se vztahuje na vzduch, jelikož rychlost světla ve vakuu a rychlost světla ve vzduchu jsou si blízké. Rychlost světla ve vzduchu je větší než v ostatních prostředích, tudíž jsou hodnoty indexu lomu větší než 1 (např. obzvláště velkých hodnot indexu lomu dosahuje oxid titaničitý ve formě rutilu, kde $n = 2,62$ až $2,90$ při monochromatickém záření sodíkové výbojky, při tzv. čáře D, která má vlnovou délku $589,3 \text{ nm}$, a při laboratorní teplotě).^{1, 3, 4, 5, 6}

2.1.2.1 Závislost indexu lomu na teplotě

Index lomu látek u kapalin klesá o 3 až $8 \cdot 10^{-4}$ jednotek indexu lomu při zvýšení teploty o 1°C . Tudíž při přesném měření je nutné udržovat konstantní teplotu termostatem. U tuhých látek se index lomu mění s teplotou méně a značí se teplotním koeficientem. Teplota je vyznačena jako exponent u symbolu indexu lomu n, např. n^{20} (kdy teplota při měření byla 20°C).

Index lomu plynů a par klesá s rostoucím tlakem.^{3,4}

2.1.2.2. Závislost indexu lomu na vlnové délce použitého záření

Index lomu je závislý na frekvenci použitého záření. Obvykle index lomu s rostoucí vlnovou délkou klesá. Hodnota indexu lomu je tedy přímo úměrná frekvenci záření. Aby měření bylo přesné používá se monochromatické záření. Vlnová délka

tohoto záření v nm je vyznačena indexem vpravo dole (např. n_{500}). Pokud se měří při spektrální čáře, je v indexu velké písmeno (např. n_D pro sodíkový dublet).^{3,4}

2.1.2.3 Index lomu v závislosti na hustotě látky

Index lomu je funkcí hustoty, která u roztoků závisí na jejich koncentraci a složení. Ke snížení rychlosti elektromagnetického záření ve hmotném prostředí dochází díky interakci s elektrickými náboji, hlavně elektrony v molekule. Rychlost šíření elektromagnetického záření tedy závisí na elektronových vlastnostech molekul vzorku. Hustota elektronového mraku molekul závisí také na hustotě vzorku. Přepočítáním na jednotkovou hustotu z hodnot indexu lomu je hustota úměrná elektronovým vlastnostem molekul a je relativně nezávislá na tlaku a teplotě vzorku. Toto lze přiblížit vztahem specifické refrakce (r)

$$r = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \frac{1}{\rho}$$

respektive vztahem molární refrakce (R)

$$R = rM$$

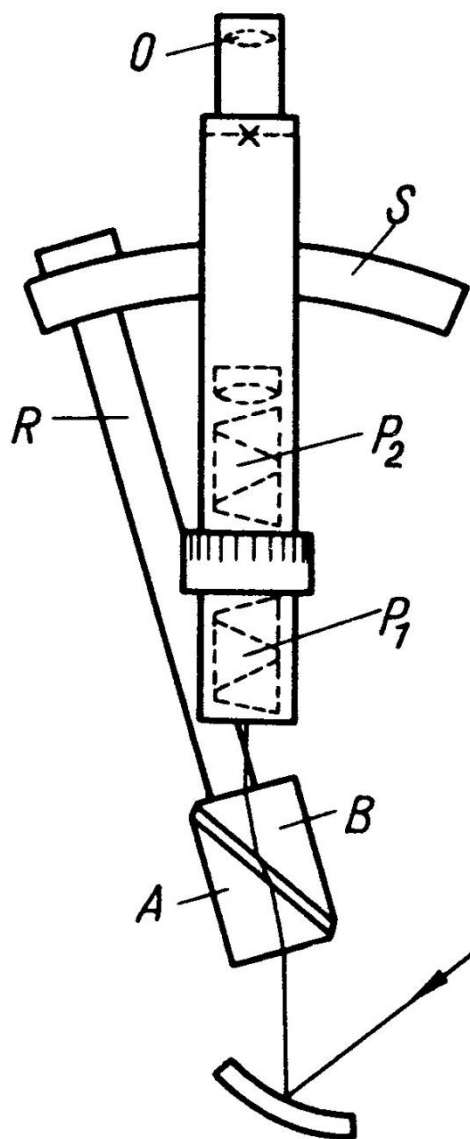
Kde M je relativní molekulová hmotnost a ρ je hustota vzorku. R nezávisí na stavu vzorku (tedy na teplotě, tlaku atd.), ale závisí jen na složení molekul. R je tedy molekulární konstanta.

Molární refrakce je aditivní vlastnost jednotlivých atomů nebo skupin tvořících molekulu. Refrakci kovalentní molekuly je možné vyjádřit jako součet refrakcí jednotlivých vazeb v molekule.^{1, 4, 5, 7}

2.1.3 Abbeho refraktometr

Z hlediska všestranné použitelnosti je Abbeho refraktometr refraktometrem univerzálním. Je schopen měřit v širokém rozsahu indexů lomu od 1,30 do 1,70. Jelikož součástí Abbeho refraktometru je kompenzátor optické disperze, lze pracovat s polychromatickým světelným zdrojem. Při dodržení

konstantní teploty je přesnost určování indexu lomu v řádu 10^{-4} jednotek indexu lomu.⁴

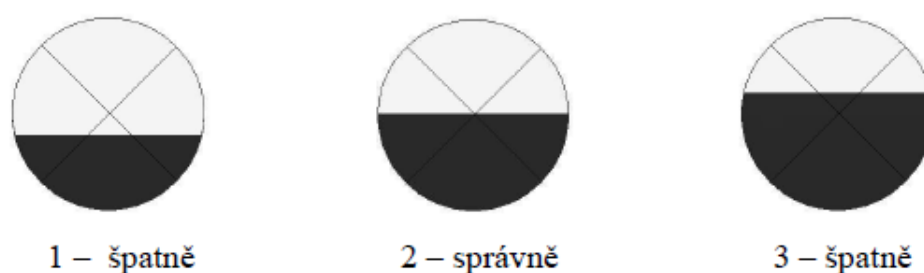


- A,B – hranoly
- R – otáčivé raménko
- P_1, P_2 – Amiciho hranoly
- S – stupnice k odečítání indexu lomu
- O – okulár

Obr. 2: Optický systém Abbeho refraktometru³

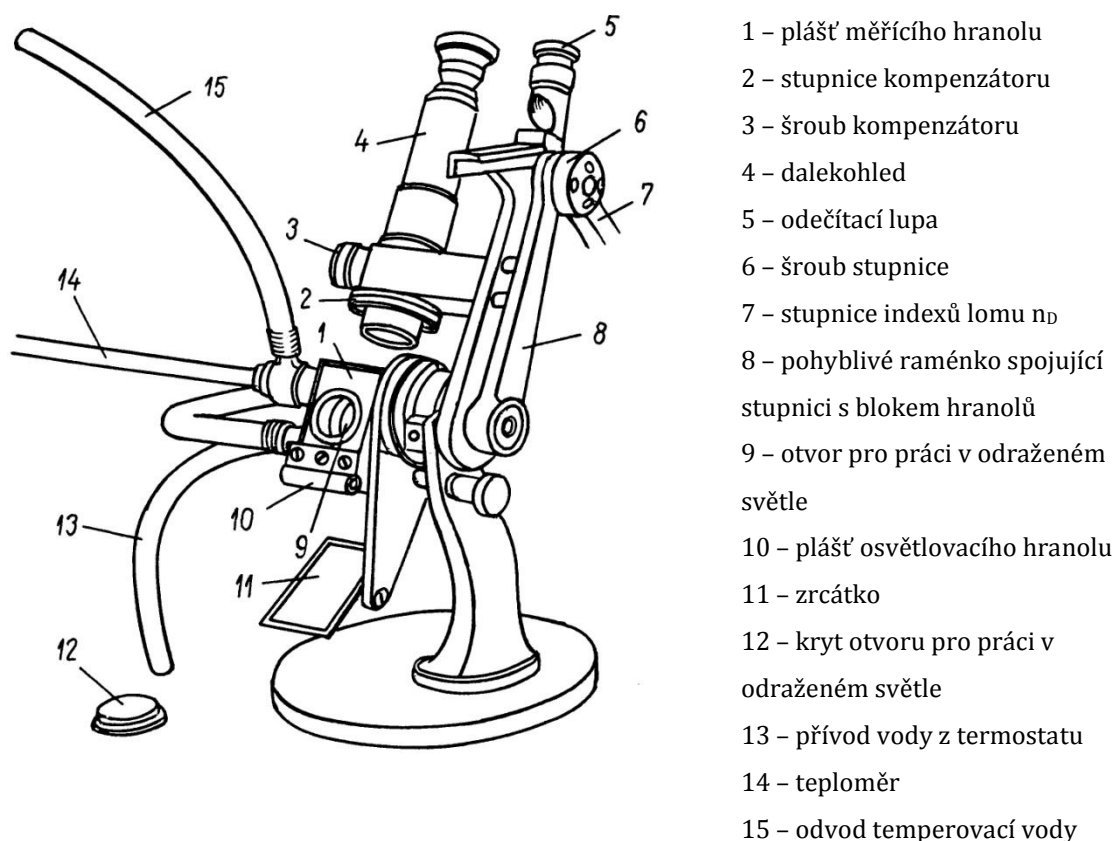
Mezi skleněnými hranoly A a B se nachází tenká vrstva měřené kapaliny. Spodní hranol A má zdrsňenou plochu, a proto do vzorku vstupuje rozptýlené záření pod různými úhly. Do horního hranolu B, a tedy i do okuláru, prochází jen paprsky s menším úhlem, než je úhel kritický. Hranoly A a B jsou vsazeny do kovových plášťů, kterými protéká voda o konstantní teplotě z termostatu. V zorném dalekohledu je nitkový kříž, kde se nastaví rozhraní mezi tmou a světlem

do středu nitkového kříže (viz. obr. 3), čehož se docílí otáčením oběma hranoly. Hodnotu indexu lomu lze odečíst na stupnici S z postavení otočného raménka. Jelikož se měří při denním světle či při žárovce, tak dochází k rozkladu světla a rozhraní je barevné. V tubusu dalekohledu je umístěn kompenzátor, což jsou u Abbeho refraktometru Amiciho hranoly. Amiciho hranoly slouží ke kompenzaci rozkladu světla a k získání bezbarvého rozhraní. Svou konstrukcí způsobí, že index lomu naměřený bílým světlem odpovídá indexu lomu naměřeného při sodíkové čáře D. Správné nastavení kompenzátoru je, když světelné rozhraní je černobílé a ostré (bez barevné složky).^{3,4}



Obr. 3: Zaměřování světelného rozhraní⁸

Klasický model Abbeho refraktometru (viz. obr. 4) s téměř nepatrnými změnami se vyrábí již přes sto let. Za výhody se dá považovat např. malá spotřeba měřené kapaliny, rychlost měření, poměrně pohodlná práce a velký rozsah indexů lomu. Za nevýhody se považuje nevelká přesnost měření disperze, nutnost kontrolovat hodnoty stupnice a kompenzátoru pro dosažení maximální přesnosti a nepohodlná práce s těkavými kapalinami.⁵



Obr. 4: Abbeho refraktometr⁵

2.1.4 Aplikace refraktometrie v klinické biochemii a jiné použití

Refraktometrie bývá v laboratoři klinické biochemie využívána jako nejsprávnější metoda k rutinnímu stanovení specifické hustoty u vzorků moče. Závislost mezi specifickou hustotou moče (tj. celková hmotnost rozpuštěných látek) a indexem lomu u vzorku moče je přímo úměrná. Jako standardní roztoky jsou používány roztoky NaCl a kontrolním roztokem je destilovaná voda. Tato aplikace platí v rozsahu hustot moče $\leq 1,035 \text{ g.l}^{-1}$.^{9,10}

Dále bývá refraktometrie v laboratoři klinické biochemie využívána ke stanovení celkové bílkoviny v séru. Za předpokladu, že koncentrace malých organických molekul a elektrolytů v séru všech pacientů je stálá a hmotnost sérových proteinů je nesrovnatelně větší, je vliv malých organických molekul a

elektrolytů na index lomu zanedbatelný. Ke kalibraci se používá standardní sérum. Nevhodná je tato metoda u hyperbilirubinemických, hemolytických, hyperglykemických, uremických a hyperlipidemických sér z důvodu pozitivní interference. K účelu měření celkové bílkoviny jsou využívány především refraktometry na principu Abbeho refraktometru.

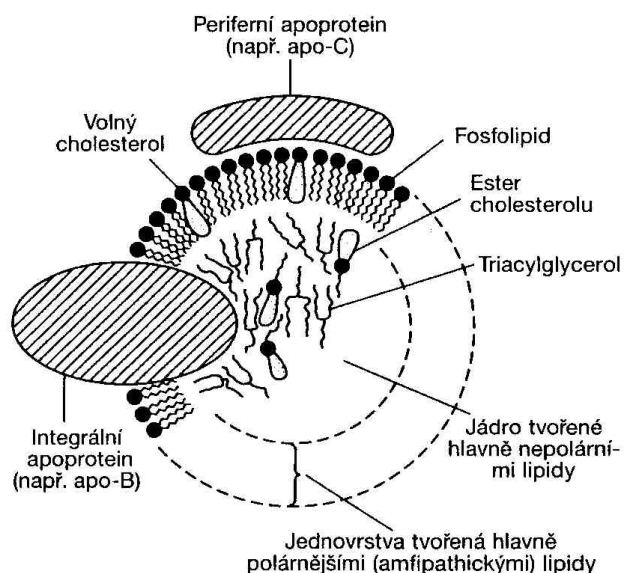
Některé modernější refraktometry jsou používány u vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) jako monitory.⁹

Refraktometrickou detekci lze použít např. i při stanovení obsahu oleje v avokádu, kdy je olej rozpuštěn ve vhodném organickém rozpouštědle¹⁹. Nebo při stanovení obsahu sušiny v kešu oříškách ve spojení s gravimetrií .²⁰

2.2 Lipoproteiny

2.2.1 Charakteristika a složení lipoproteinů

Lipidy se v krevní plasmě transportují v podobě lipoproteinových částic. Jelikož lipidy jsou ve vodě nerozpustné a krevní plasma představuje vodné prostředí, jsou nepolární lipidy (triacylglyceroly a estery cholesterolu) soustředěny v jádru lipoproteinu a obal tvoří převážně amfipatické lipidy (fosfolipidy, cholesterol) a proteiny. Vzniklá micelární částice má na povrchu monovrstvu složenou z fosfolipidů a cholesterolu, jejichž hydrofilní části jsou orientovány vně a hydrofóbní části dovnitř částice. Proteinová složka v lipoproteinové částici se nazývá apolipoprotein (apo), dříve apoprotein. Apolipoprotein se vyskytuje buďto na povrchu částice (periferní apolipoprotein), nebo je do částice zanořený (integrální apoprotein). Integrální apoprotein je orientován tak, aby jeho hydrofilní část byla na straně vodného prostředí krevní plasmy. Jádro částice je tvořeno především nepolárními lipidy (triacylglyceroly, estery cholesterolu).^{11, 12}



Obr. 5: Obecná struktura plasmatického lipoproteinu.¹¹

2.2.2 Skupiny lipoproteinů

Byly identifikovány skupiny lipoproteinů, které jsou fyziologicky důležité a významné pro klinickou diagnózu, na základě jejich hustoty. Tuk má nižší hustotu než voda tudíž, čím je poměr lipidy:proteiny vyšší, tím klesá jejich hustota.^{9, 11}

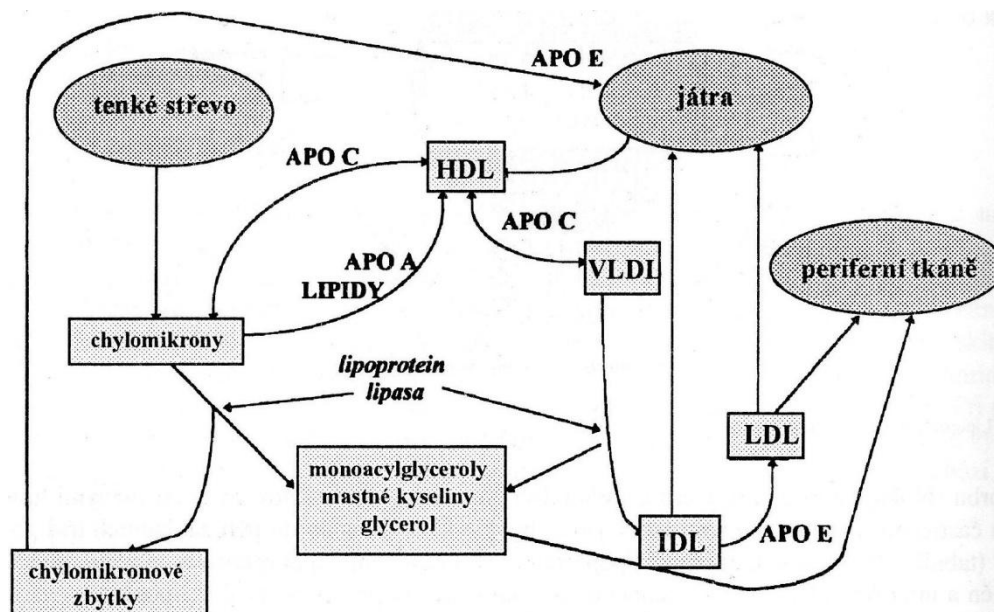
Skupiny lipoproteinů:

- chylomikrony
- lipoproteiny o velmi nízké hustotě = VLDL (very low-density lipoproteins)
- lipoproteiny o střední hustotě = IDL (intermediate density lipoproteins)
- lipoproteiny o nízké hustotě = LDL (low-density lipoproteins)
- lipoproteiny o vysoké hustotě = HDL (high-density lipoproteins)^{9, 11}

Tab. 1: Složení lipoproteinů v plasmě u člověka¹¹

Frakce	Zdroj	Průměr (nm)	Relativní hustota	Sf	Složení						
					Protein (%)	Celkový lipid (%)	Procenta celkového lipidu				
							TAG	Fosfolipid	Ester cholesterolu	Cholesterol (volný)	Volné mastné kyseliny
Chylomikrony	Střevo	90–1000	<0,95	>400	1-2	98-99	88	8	3	1	...
VLDL	Játra (střevo)	30–90	0,95–1,006	20–400	7-10	90-93	56	20	15	8	1
IDL	VLDL	25–30	1,006–1,019	12–20	11	89	29	26	34	9	1
LDL	VLDL	20–25	1,019–1,063	2-12	21	79	13	28	48	10	1
HDL₂	Játra a střevo. VLDL,	10–20	1,063–1,125		33	67	16	43	31	10	...
HDL₃	Chylomikrony	7,5–10	1,125–1,210		57	43	13	46	29	6	6
Albumin-FFA	Tuková tkáň		>1,2810		99	1	0	0	0	0	100

FFA – volné mastné kyseliny, VLDL (lipoproteiny o velmi vysoké hustotě) je minoritní frakce, jejíž hustota je 1,21 – 1,25



Obr. 6: Lipoproteinová kaskáda⁹

2.2.2.1 Chylomikrony

Lipidy pocházející z potravy jsou do krevního oběhu přenášeny pomocí lymfatického systému ve formě chylomikronů. Tvoří se i v době nenasycenosti, pak se jejich lipidy skládají z lipidů pocházejících ze žluči a střevní sekrece. Tvorba chylomikronů roste s příjmem triacylglycerolů. Poločas odstranění chylomikronů z krevního oběhu u člověka je cca hodina. Triacylglyceroly nacházející se v chylomikronech obsahujících apo C (získaný při interakci s HDL) hydrolyzuje lipoproteinová lipasa, která se nachází ve stěnách krevních kapilár. Jedná se o největší lipoproteinové částice, avšak díky vysokému podílu triacylglycerolů a nízkému podílu proteinů mají nejnižší hustotu.^{9,11}

2.2.2.2 Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL)

VLDL většinou pocházejí z parenchymálních buněk jater a jsou syntetizovány ze zbytkových částic chylomikronů. Jejich funkce je především transportovat triacylglyceroly z jater do mimojaterních tkání. Podobně jako u chylomikronů hydrolyzuje triacylglyceroly lipoproteinová lipasa u částic obsahujících apo C. VLDL obsahující apo-B-100 je prekursorem pro IDL a IDL je prekursorem pro LDL. Během procesu odbourávání částic VLDL jejich apo C a volný cholesterol získají částice HDL.^{9,11}

2.2.2.3 Lipoproteiny o střední hustotě (IDL)

IDL částice mohou být vychytávány játry anebo být dále přeměněny na částice LDL, poté co odevzdají částicím HDL apo E a jsou vystaveny působení jaterní triacylglycerolové lipasy.⁹

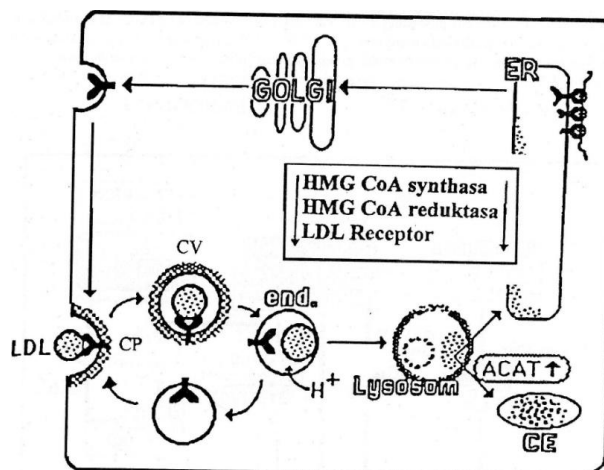
2.2.2.4 Lipoproteiny o nízké hustotě (LDL)

LDL částice vznikají z částic IDL poté, co IDL ztratí část svých triacylglycerolů, proteinů a esterů cholesterolu. LDL částice obsahující ve své struktuře apo B-100 (apo B-100 je obsaženo ve velkých částicích VLDL, které jsou v krevním oběhu metabolizovány na LDL přes apo B/LDL receptor) jsou rozpoznány specifickými receptory, které se nacházejí na určité oblasti buněčné membrány (coated pits). V této oblasti dochází k pinocytóze a následnému odbourání LDL uvnitř v buňce. Tento proces vede k ukládání cholesterolu v cytoplasmě buněk různých tkání. Je-li hladina volného cholesterolu zvýšená, je inhibována aktivita enzymu regulujícího endogenní syntézu cholesterolu, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA redukasy, a tvorba coated pits. Zároveň dochází k aktivaci acyl-cholesterolacyltransferasy, což je enzym katalyzující přeměnu volného cholesterolu na estery cholesterolu v buňkách. Při zvýšené hladině LDL v důsledku genetického poškození receptorů či glykaci a jejich následné oxidaci dochází k nerekceptorové pinocytóze LDL makrofágy retikuloendoteliárního systému. Dojde-li k nahromadění cholesterolu, makrofágy se mění v pěnové buňky, po jejichž rozpadu se tvoří aterosklerotické pláty na cévních stěnách. Vysoká hladina LDL v krvi je brána jako kardiovaskulární rizikový faktor.

Kardiovaskulární nemoci jsou primárním důvodem smrti v pokrokových zemích.^{9,}

16, 17

LDL částice jsou heterogenní, co se týče velikosti, hustoty a složení. Tyto údaje vedou k definování konkrétních podtříd LDL.¹⁸



Obr. 7: Receptory zprostředkovaný metabolismus LDL částic ⁹

2.2.2.5 Lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL)

HDL vzniká v buňkách střevní sliznice a v játrech. Dělí se na dvě hustotní frakce: HDL₂ a HDL₃, přičemž HDL₂ jsou částice větší. HDL je důležitý zejména při zpětném transportu cholesterolu z periferních tkání do jater, kde je v podobě žlučových kyselin odváděn žlučí. HDL má protektivní roli při kardiovaskulárních onemocněních. ⁹

2.2.3 Separace lipoproteinů

Lipoproteiny lze separovat na základě jejich hustoty ultracentrifugací (hustota jednotlivých lipoproteinových skupin je v tab. 1), elektroforézou, precipitací, imunochemickými metodami.^{9, 13}

2.2.3.1 Ultracentrifugace

V roztocích NaCl o různých hustotách lze ultracentrifugací rozdělit lipoproteiny do jednotlivých skupin. Metoda je založena na odlišné specifické hustotě, která je závislá na složení lipoproteinů. Jednotlivé lipoproteinové skupiny flotují nebo sedimentují při různých hustotách prostředí (viz. tab. 1) v gravitačním poli ultracentrifugy. Rychlosti, kterou se částice pohybuje směrem k hladině, odpovídá flotační konstanta S_f (viz. tab. 1)^{9, 13, 14}

2.2.3.2 Elektroforéza

Lipoproteiny lze dělit na základě jejich rozdílného elektrického náboje v elektrickém poli v agarosovém gelu v barbiturátovém pufru o pH 8,6. Hodnocení probíhá na základě rozdílu pohyblivosti jednotlivých skupin lipoproteinů. Separované frakce jsou nejčastěji barveny olejovou červení. Různá barvitelnost závisí na různém poměru bílkovin a lipidů. Nelze vyvodit kvantitativní výsledek, tudíž se od této metody ustupuje. Elektroforeogram lipoproteinů na základě rostoucí elektroforetické pohyblivosti může vypadat takto:

1. chylomikrony – start
2. β -lipoproteiny (LDL)
3. pomalé pre- β -lipoproteiny (Lp(a) nebo IDL)
4. pre- β -lipoproteiny (VLDL)
5. α -1-lipoproteiny (HDL)^{9, 13}

2.3 Stanovení cholesterolu, triacylglycerolů a celkové bílkoviny

2.3.1 Stanovení cholesterolu

V plasmě či séru se nachází cholesterol ve dvou formách a to, z jedné třetiny ve formě volného cholesterolu a ze dvou třetin ve formě esterů cholesterolu. Toto je nutné brát v úvahu při stanovení celkového cholesterolu. Nejběžněji používanou metodou je enzymatické fotometrické stanovení. ^{9, 13}

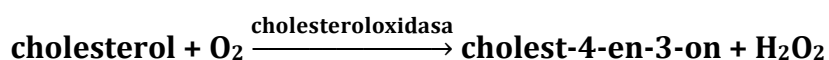
2.3.1.1 Princip enzymatického fotometrického stanovení cholesterolu

Enzymatické fotometrické stanovení cholesterolu využívá sledu následných enzymaticky katalyzovaných reakcí:

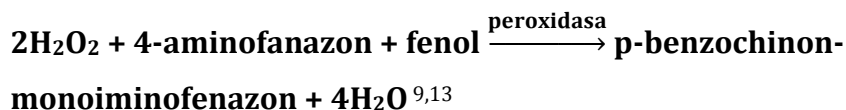
1. Hydrolýza esterů cholesterolu na cholesterol a volnou mastnou kyselinu za katalýzy cholesterolesterasou:



2. Oxidace cholesterolu na cholest-4-en-3-on a peroxid vodíku za katalýzy cholesterooloxidasou:



3. Oxiдаční kopulace substituovaného fenolu s 4-aminofenazonem za účasti kyslíku, který je uvolněn z peroxidu vodíku působením peroxidasy. Vzniká červeně zbarvený indikátor, jehož absorbance se stanoví fotometricky:



2.3.2 Stanovení triacylglycerolů (TAG)

Triacylglyceroly se stanovují v séru či plasmě. Nejpoužívanější stanovení je enzymatická fotometrická metoda.¹³

2.3.2.1 Princip enzymatického fotometrického stanovení TAG

1. TAG jsou hydrolyzovány na glycerol a volné mastné kyseliny za katalýzy lipoproteinové lipasy (LPL)

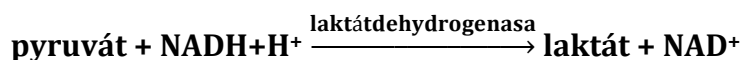


2. Fosforylace glycerolu na glycerol-3-fosfát za katalýzy glycerolkinasou



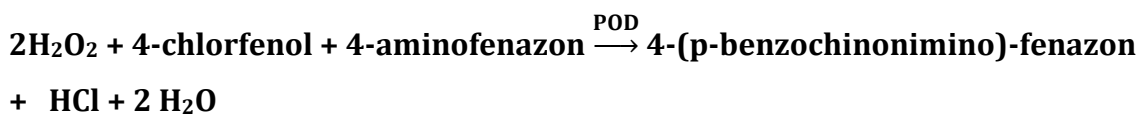
První dvě reakce jsou společné pro všechny enzymatické stanovení TAG. Používaná stanovení se liší podle toho, zda se dále stanovuje vznikající glycerol-3-fosfát či ADP.

Metoda dle Bucola a Davida využívá ADP, který reaguje s fosfoenolpyruvátem za katalýzy pyruvátkinasy za vzniku pyruvátu. Pyruvát se dále stanovuje podle reakce:



Úbytek koncentrace NADH během průběhu reakce je přímo úměrný koncentraci TAG. Absorbance NADH se měří při 340 nm.

Metoda GPO-POD (glycerol-3-fosfát oxidasa – peroxidasa) využívá glycerol-3-fosfát, který je oxidován za katalýzy GPO na dihydroxyaceton-3-fosfát a peroxid vodíku. Peroxid vodíku je následně stanoven Trinderovou reakcí:



Měří se absorbance vzniklého červeného 4-(p-benzochinonimino)-fenazonu při 505 nm.^{9,13}

2.3.3 Stanovení celkové bílkoviny (CB)

Stanovení celkové bílkoviny znesnadňuje různorodost bílkovin v séru z hlediska různé reaktivity jednotlivých molekul.¹³

2.3.3.1 Biuretová metoda

Je nejrozšířenější metodou v rutinním provozu. Není vhodná ke stanovení CB u vzorků s nízkou koncentrací CB (např. moč).¹³

2.3.3.1.1 Princip biuretové metody

Peptidy a bílkoviny v alkalickém prostředí s měďnatými ionty poskytují červenofialově zbarvený komplex, jehož intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu peptidových vazeb a jeho absorbance se měří při 545 nm.^{9, 13}

2.3.3.2 Kjeldahlova metoda

Je používána jako metoda referenční. Používá se ke stanovení CB při přípravě standardních a kontrolních sér. Metoda je založena na stanovení koncentrace dusíku CB.¹³

3. Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce je zjištění vztahu mezi indexem lomu a koncentrací sledovaných lipoproteinových částic LDL. Znalost této závislosti je stěžejní pro výpočet velikosti částic metodou HPLC-LLSD, kde vzorec pro výpočet obsahuje veličinu dn/dc . Navíc je třeba ještě zjistit, zda se charakter závislosti mění s různým chemickým složením částic LDL, tj. s obsahem cholesterolu, triacylglyceridů a proteinů. Závislost indexu lomu na koncentraci získáme změřením postupně ředěných vzorků jednotlivých izolovaných lipoproteinů. Z vyhodnocených závislostí zjistíme případnou nutnost stanovit tuto závislost individuálně pro každý biologický vzorek.

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- Roztok NaCl o $\rho = 1,006 \text{ g.ml}^{-1}$
- Roztok NaCl+KBr o $\rho = 1,182 \text{ g.ml}^{-1}$
- Vzorky s LDL
- Ultračistá voda 18,2 M Ω .cm

4.2 Použité přístroje

- Ultracentrifuga Optima L-100 XP, Beckman Coulter s.r.o, Praha, Česká republika
- Analytické váhy Sartorius Analytic AC 120 S, Goettingen, Německo
- Vodní termostat Haake 5, Haake DC 10, Thermo electron corporation, Waltham, USA
- Koncentrátor vzorků Thermovap TV10+, Ecom, Praha, Česká republika
- Abbeho refraktometr, Krüs, Hamburg, Německo
- Laboratorní úprava vody Direct Q 3 UV, Millipore, Praha, Česká republika

4.3 Pracovní postup

4.3.1 Příprava vzorků

Pěti dobrovolným dárčům byly odebrány vzorky krve pro získání jejich frakce LDL a případně pro získání informací o jejich hodnotách celkového cholesterolu, TAG, HDL a celkové bílkovině. Vzorky krve se odebíraly do zkumavek o objemu 8 ml, které již obsahovaly antikoagulans EDTA. Následně byla separována plasma centrifugací 10 minut při 3000 RPM.

Do ultracentrifugačních zkumavek bylo odpipetováno 3 ml získané plasmy a 1,5 ml hustotního roztoku chloridu sodného o hustotě $1,006 \text{ g.ml}^{-1}$. Ultracentrifugace probíhala dvacet hodin při 10°C a 38000 RPM. Po ultracentrifugaci se odebere vrchních 1,5 ml supernatantu (který se může použít ke stanovení VLDL) a ke zbytku se přidá 1,5 ml hustotního roztoku chloridu sodného + bromidu draselného o hustotě $1,182 \text{ g.ml}^{-1}$. Tyto ultracentrifugační zkumavky byly vloženy do ultracentrifugy na dvacet čtyři hodin při 10°C a 38000 RPM. Po ultracentrifugaci bylo odebráno vrchních 1,5 ml supernatantu, který již obsahoval LDL částice, do zkumavek.

Jedna zkumavka s daným vzorkem LDL byla použita ke zjištění hladiny cholesterolu, TAG a proteinů v částicích LDL. Do této zkumavky k 1,5 ml odebraného supernatantu bylo přidáno 1,5 ml roztoku NaCl o hustotě $1,006 \text{ g.ml}^{-1}$. Takto bylo docíleno původní koncentrace LDL v plasmě.

Z ostatních zkumavek bylo odebráno 0,5 ml supernatantu s částicemi LDL do předem zvážených zkumavek a tyto se nechaly vysušit ve vakuové sušárně při 60°C . Po vysušení byla zkumavka se vzorkem zvážena a následným odečtením hmotnosti čistých zkumavek a hmotnosti slepé zkoušky byla zjištěna hmotnost vzorku.

4.3.2 Měření indexu lomu

K měření indexu lomu byly použity vzorky s LDL částicemi přímo po ultracentrifugaci (tedy 2x koncentrovanější než je koncentrace LDL v plasmě) nebo vzorky, které se po ultracentrifugaci ředily na objem plasmy.

Měření indexu lomu probíhalo na Abbeho refraktometru. Konstantní teplota 25 °C byla zajištěna vodním termostatem, který byl k Abbeho refraktometru připojen. Vzorek byl nanášen na měřící hranol refraktometru o objemu 40 μl a následně přiklopen pomocným hranolem. Poté se v pravém okuláru správně nastavilo světelné rozhraní na nitkovitém kříži (viz. obr. 3) a v levém okuláru se odečetla hodnota indexu lomu.

Mezi jednotlivými měřeními musel být hranol pečlivě odmaštěn vodou s detergentem a následně opláchnut velkým množstvím destilované vody. Pak byly hranoly osušeny.

4.4 Výsledky

Frakce LDL získaná ultracentrifugací má podstatně menší objem než původní vzorek, je tedy po odebrání ze zkumavky zahuštěna; objem odebraného množství lze upravit podle potřeby. V této práci jsem pracovala buď se vzorkem “zahuštěným” (odebráno poloviční množství roztoku se separovaným LDL), nebo se vzorkem “ředěným”, který byl doplněn na původní objem plasmy vzatý do práce.

Základní parametry měřených vzorků udává tab. 2. Výsledky měření jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tab. 3 – 14, grafické znázornění závislosti indexu lomu na koncentraci ukazují obr. 8 – 25.

Tab. 2: Použité vzorky

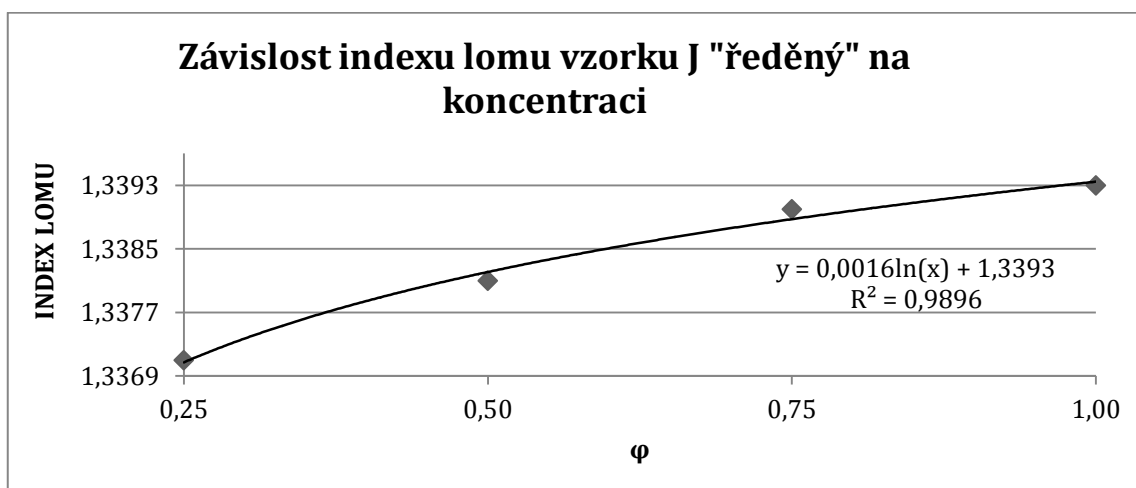
Vzorek	Pohlaví osoby	Věk osoby
J	muž	30 let
B	žena	37 let
J+B (směs vzorků s LDL J a B)	-	-
T	žena	66 let
K	žena	22 let
S	žena	22 let

4.4.1 Vzorek J “ředěný”

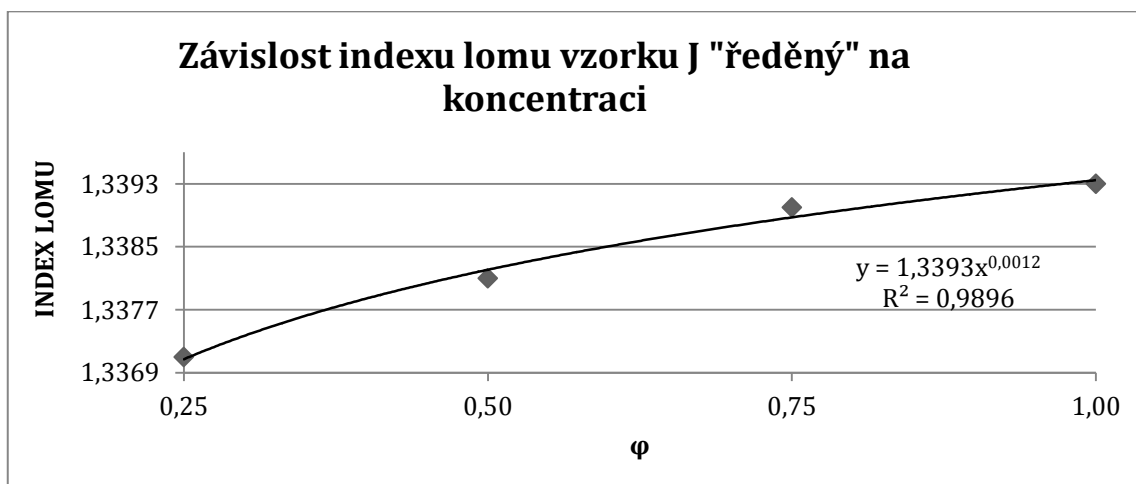
Tab. 3: Indexy lomu vzorku J “ředěný”

φ	n_1	n_2	n_3	\tilde{n}	s
1,00	1,3393	1,3394	1,3393	1,3393	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,75	1,3390	1,3391	1,3390	1,3390	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,50	1,3381	1,3381	1,3380	1,3381	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,25	1,3372	1,3371	1,3371	1,3371	$5,908 \cdot 10^{-5}$

Při $\varphi = 1,00$ je koncentrace vzorku $59,4 \text{ mg.ml}^{-1}$.



Obr. 8: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku J “ředěný” na koncentraci – typ trendu a regrese logaritmický



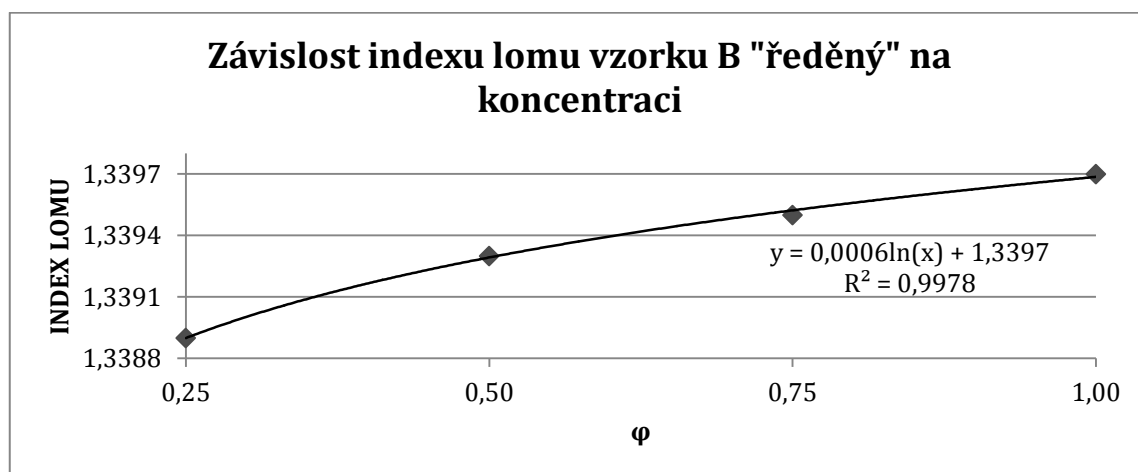
Obr. 9: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku J “ředěný” na koncentraci – typ trendu a regrese mocninný

4.4.2 Vzorek B "ředěný"

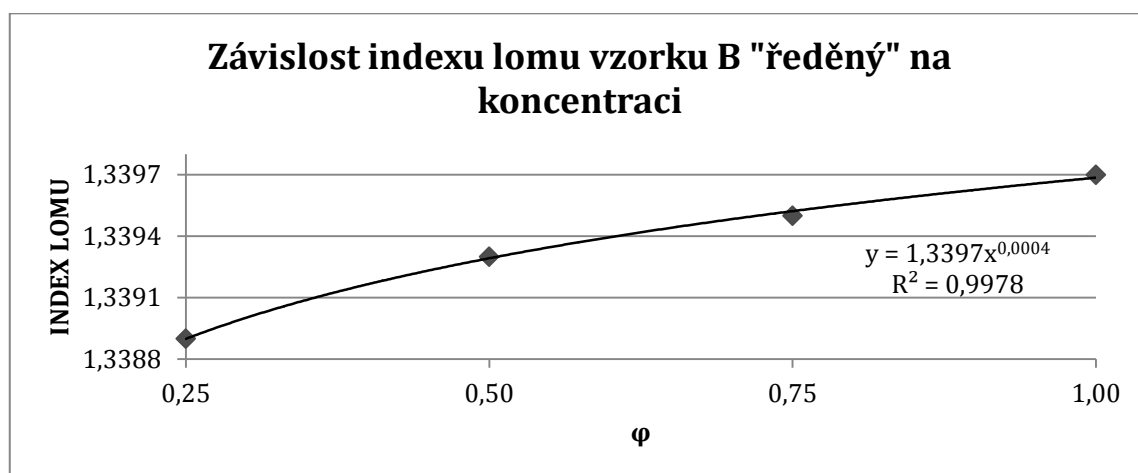
Tab. 4: Indexy lomu vzorku B "ředěný"

φ	n_1	n_2	n_3	\tilde{n}	s
1,00	1,3398	1,3397	1,3397	1,3397	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,75	1,3395	1,3394	1,3395	1,3395	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,50	1,3393	1,3393	1,3392	1,3393	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,25	1,3389	1,3390	1,3389	1,3389	$5,908 \cdot 10^{-5}$

Při $\varphi = 1,00$ je koncentrace vzorku $57,8 \text{ mg.ml}^{-1}$.



Obr. 10: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku B "ředěný" na koncentraci – typ trendu a regrese logaritmický



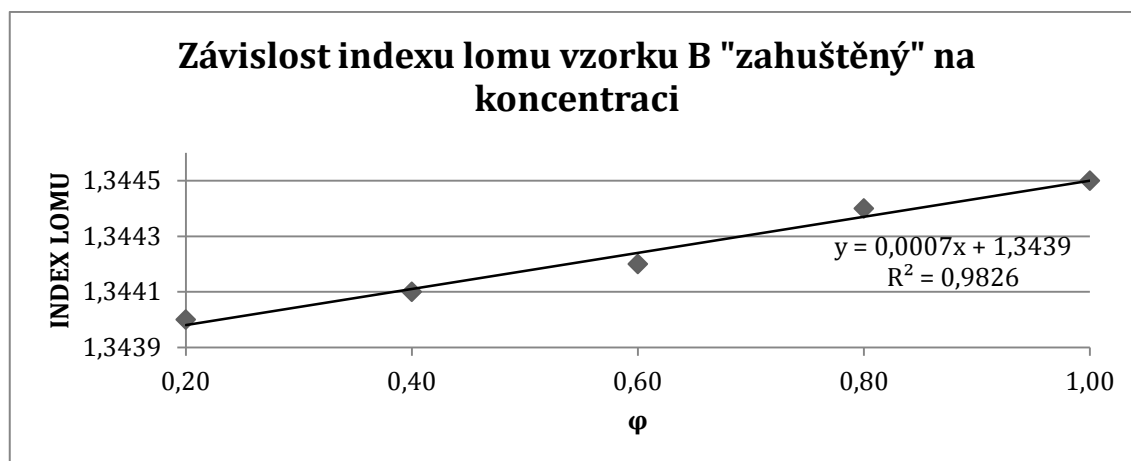
Obr. 11: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku B "ředěný" na koncentraci – typ trendu a regrese mocninný

4.4.3 Vzorek B "zahuštěný"

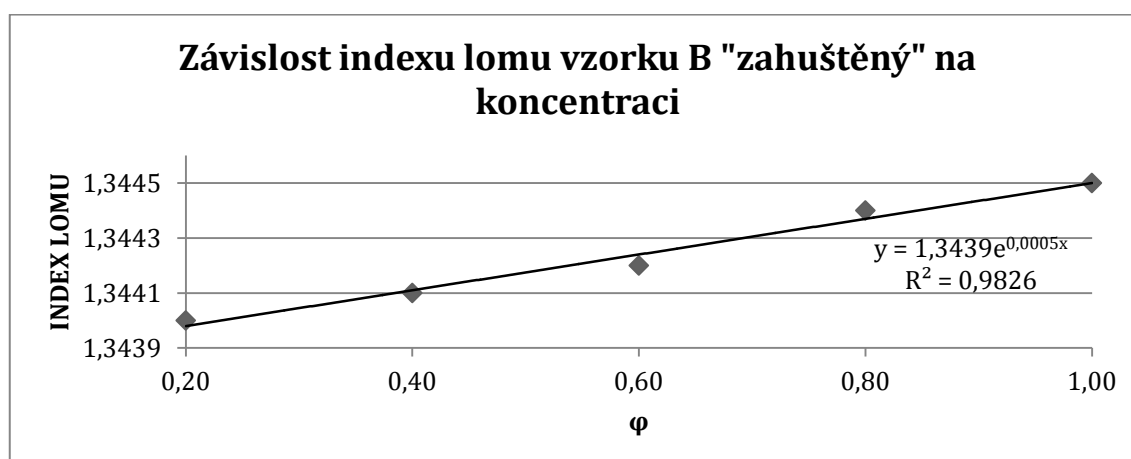
Tab. 5: Indexy lomu vzorku B "zahuštěný"

φ	n_1	n_2	n_3	\tilde{n}	s
1,00	1,3445	1,3445	1,3446	1,3445	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,80	1,3445	1,3444	1,3444	1,3444	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,60	1,3442	1,3442	1,3443	1,3442	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,40	1,3440	1,3441	1,3441	1,3441	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,20	1,3440	1,3440	1,3440	1,3440	0

Při $\varphi = 1,00$ je koncentrace vzorku $91,0 \text{ mg.ml}^{-1}$.



Obr. 12: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku B "zahuštěný" na koncentraci – typ trendu a regrese lineární



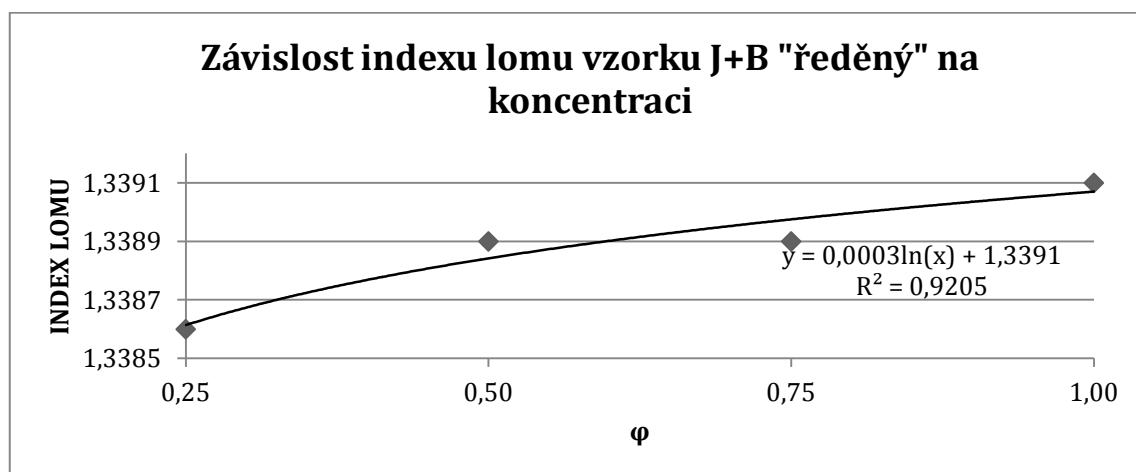
Obr. 13: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku B "zahuštěný" na koncentraci – typ trendu a regrese exponenciální

4.4.4 Vzorek J+B "ředěný"

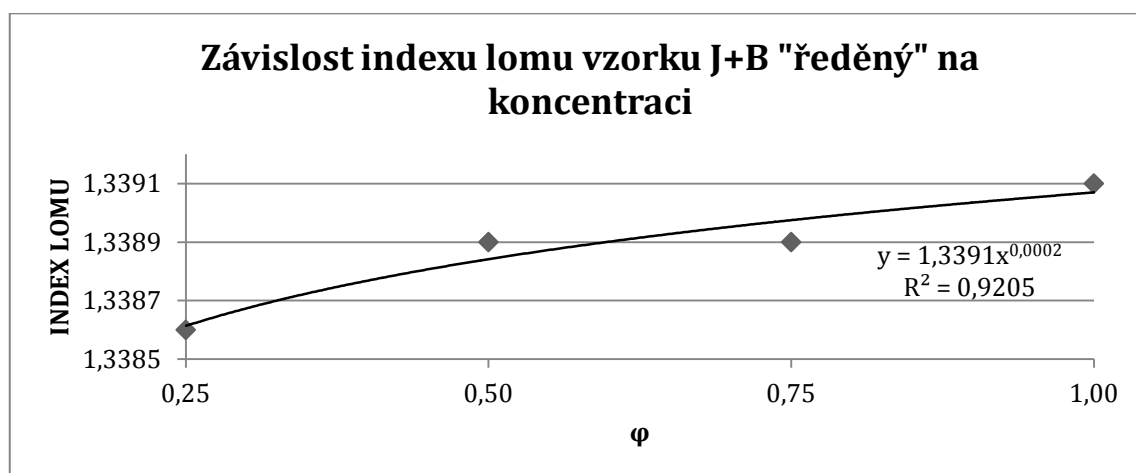
Tab. 6: Indexy lomu vzorku J+B "ředěný"

φ	n_1	n_2	n_3	\tilde{n}	s
1,00	1,3391	1,3391	1,3391	1,3391	0
0,75	1,3390	1,3389	1,3389	1,3389	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,50	1,3389	1,3389	1,3388	1,3389	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,25	1,3387	1,3386	1,3386	1,3386	$5,908 \cdot 10^{-5}$

Při $\varphi = 1,00$ je koncentrace vzorku $58,8 \text{ mg.ml}^{-1}$.



Obr. 14: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku J+B "ředěný" na koncentraci – typ trendu a regrese logaritmický



Obr. 15: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku J+B "ředěný" na koncentraci – typ trendu a regrese mocninný

4.4.5 Vzorek T “ředěný”

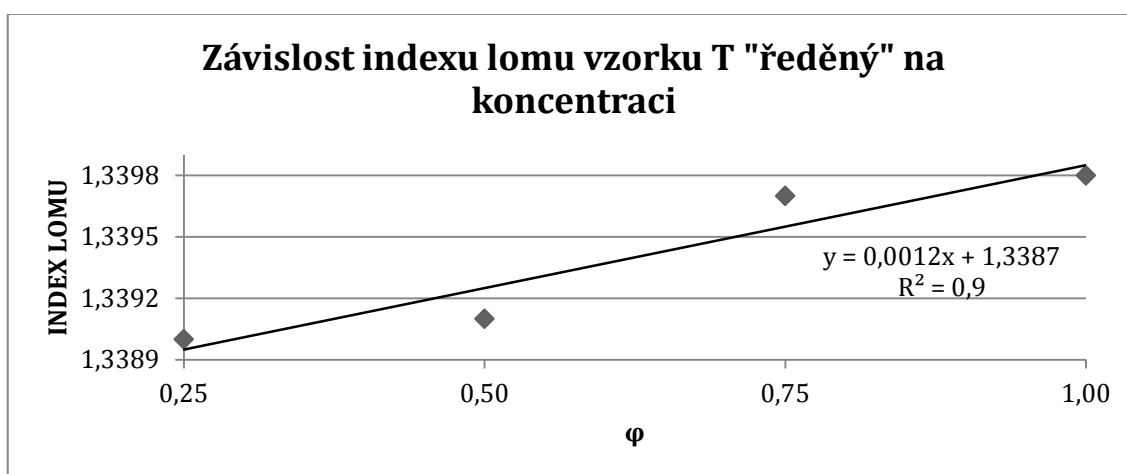
Tab. 7: Biochemická analýza LDL vzorku T

CHOLESTEROL [mmol.l ⁻¹]	TRIACYLGLYCEROLY [mmol.l ⁻¹]	CELKOVÁ BÍLKOVINA [g.l ⁻¹]
4,28	0,43	0,60

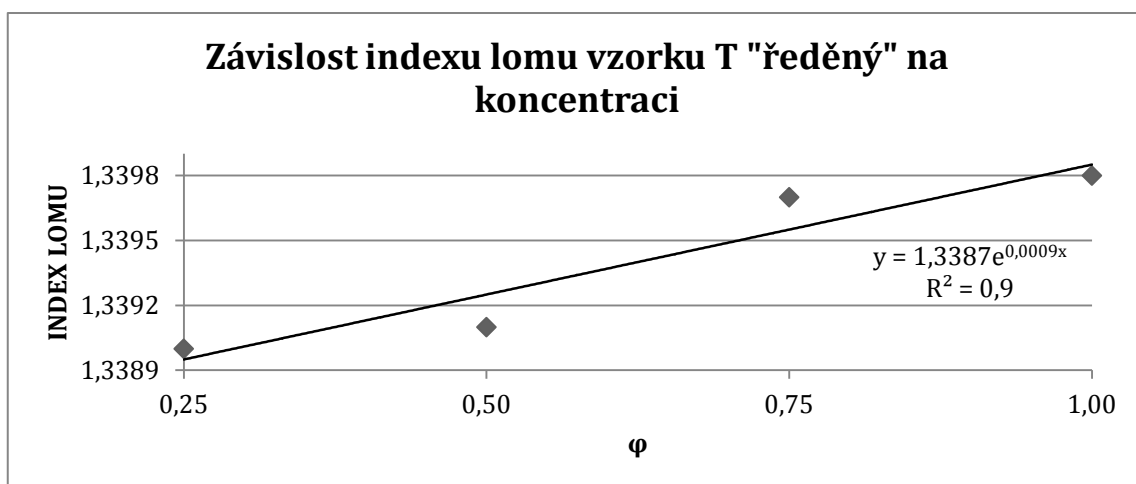
Tab. 8: Indexy lomu vzorku T “ředěný”

φ	n_1	n_2	n_3	\tilde{n}	s
1,00	1,3398	1,3398	1,3397	1,3398	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,75	1,3397	1,3398	1,3397	1,3397	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,50	1,3391	1,3391	1,3391	1,3391	0
0,25	1,3390	1,3390	1,3389	1,3390	$5,908 \cdot 10^{-5}$

Při $\varphi = 1,00$ je koncentrace vzorku $60,1 \text{ mg.ml}^{-1}$.



Obr. 16: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku T “ředěný” na koncentraci – typ trendu a regrese lineární



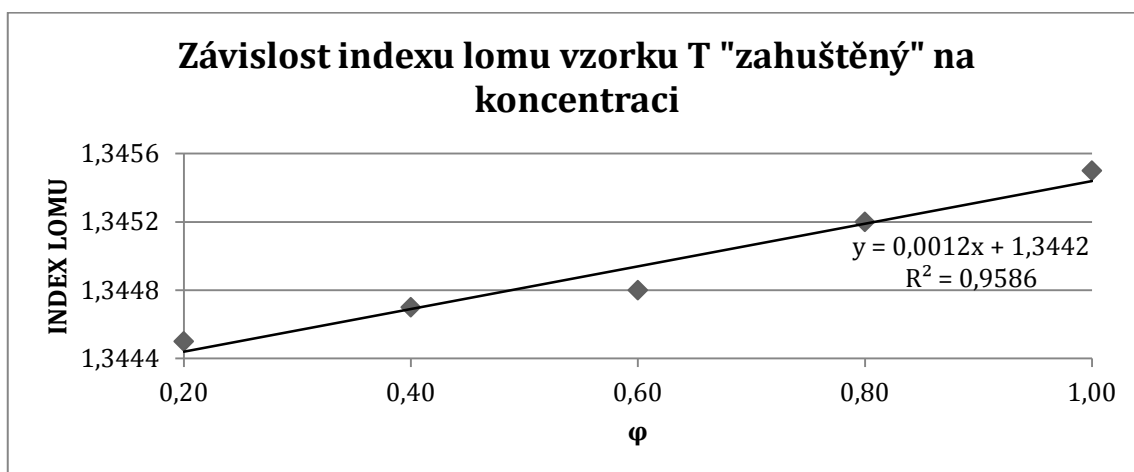
Obr. 17: Graf závislosti indexu lomu n vzorku **T "ředěný"** na koncentraci – typ trendu a regrese exponenciální

4.4.6 Vzorek T "zahuštěný"

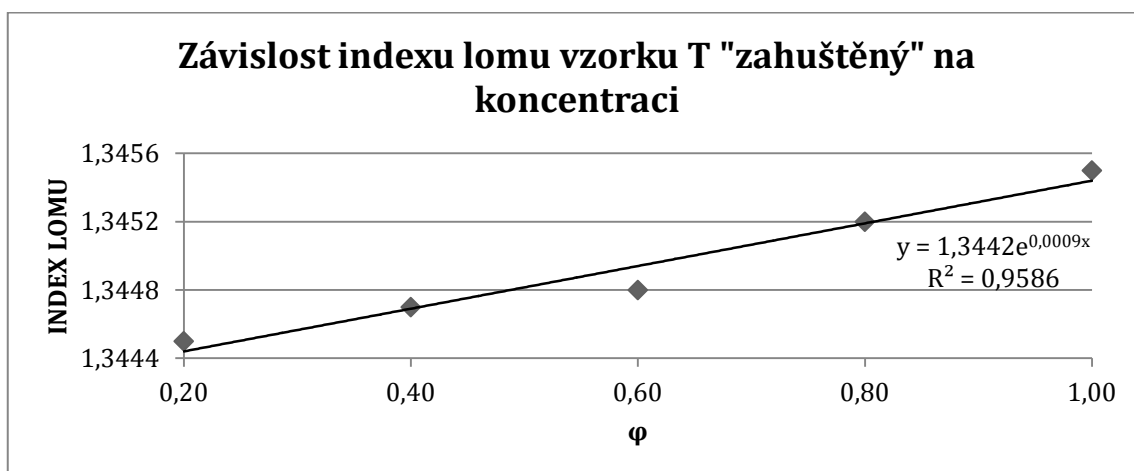
Tab. 9: Indexy lomu vzorku T "zahuštěný"

φ	n_1	n_2	n_3	\tilde{n}	s
1,00	1,3454	1,3455	1,3455	1,3455	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,80	1,3452	1,3452	1,3452	1,3452	0
0,60	1,3449	1,3448	1,3448	1,3448	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,40	1,3447	1,3447	1,3446	1,3447	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,20	1,3445	1,3445	1,3445	1,3445	0

Při $\varphi = 1,00$ je koncentrace vzorku $88,5 \text{ mg.ml}^{-1}$.



Obr. 18: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku T "zahuštěný" na koncentraci – typ trendu a regrese lineární



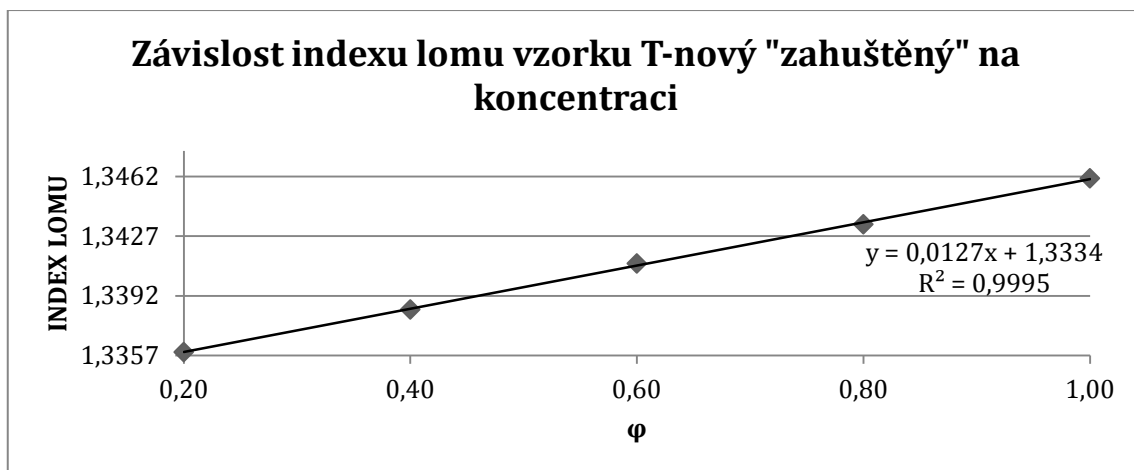
Obr. 19: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku T "zahuštěný" na koncentraci – typ trendu a regrese exponenciální

4.4.7 Vzorek T-nový "zahuštěný"

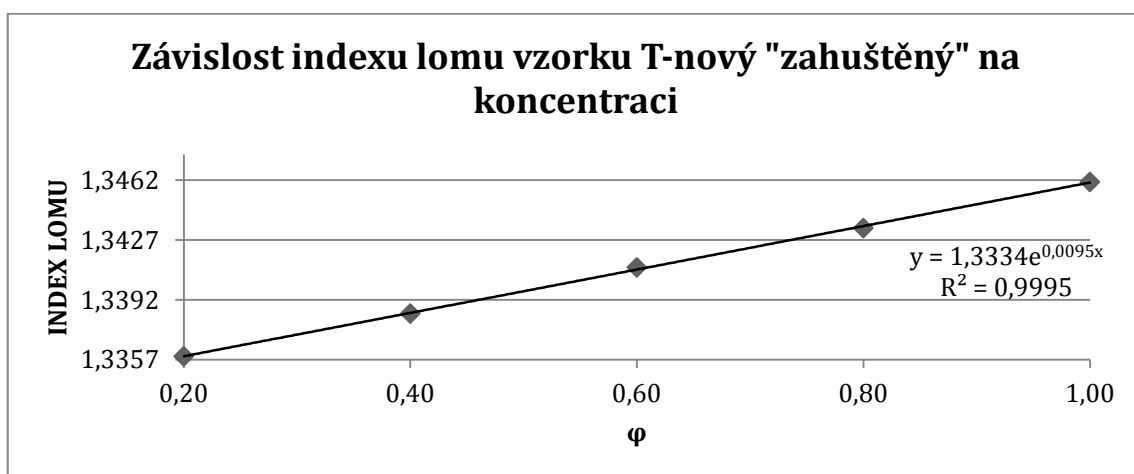
Tab. 10: Indexy lomu vzorku T-nový "zahuštěný"

φ	n_1	n_2	n_3	\tilde{n}	s
1,00	1,3461	1,3461	1,3461	1,3461	0
0,80	1,3434	1,3433	1,3434	1,3434	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,60	1,3411	1,3411	1,3411	1,3411	0
0,40	1,3384	1,3384	1,3385	1,3384	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,20	1,3359	1,3360	1,3359	1,3359	$5,908 \cdot 10^{-5}$

Při $\varphi = 1,00$ je koncentrace vzorku $96,8 \text{ mg.ml}^{-1}$.



Obr. 20: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku T-nový "zahuštěný" na koncentraci – typ trendu a regrese lineární



Obr. 21: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku T-nový "zahuštěný" na koncentraci – typ trendu a regrese exponenciální

4.4.8 Vzorek K "zahuštěný"

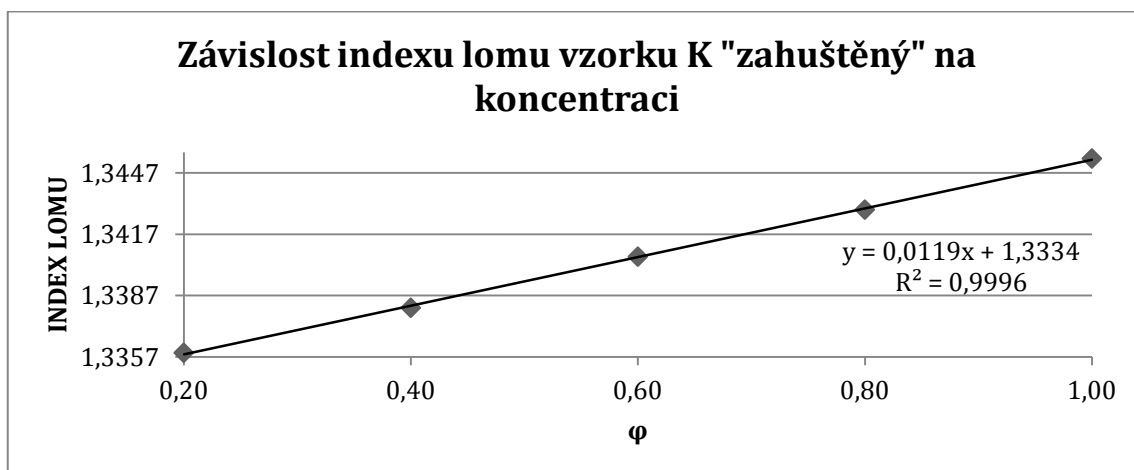
Tab. 11: Biochemická analýza LDL vzorku K

CHOLESTEROL [mmol.l ⁻¹]	TRIACYLGLYCEROLY [mmol.l ⁻¹]	CELKOVÁ BÍLKOVINA [g.l ⁻¹]
6,21	0,75	0,48

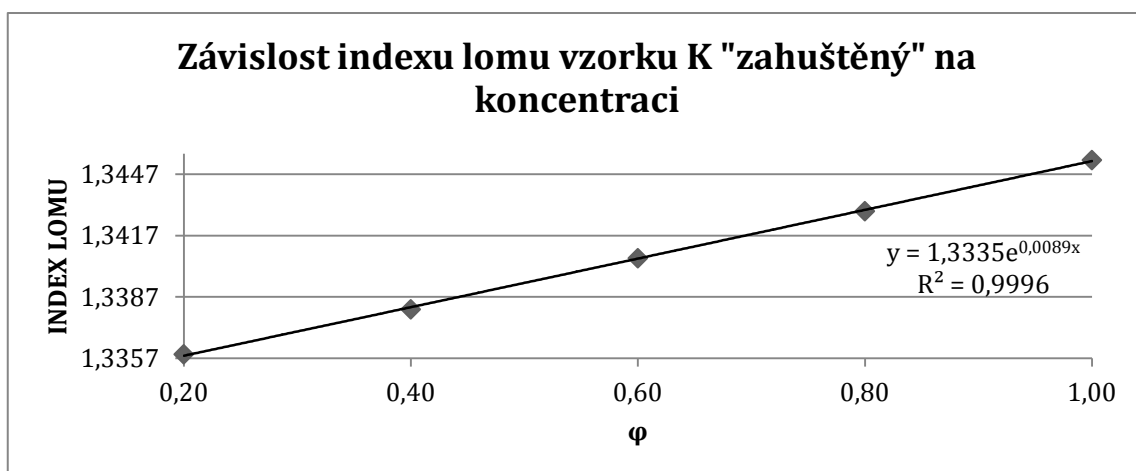
Tab. 12: Indexy lomu vzorku K "zahuštěný"

φ	n_1	n_2	n_3	\tilde{n}	s
1,00	1,3453	1,3454	1,3454	1,3454	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,80	1,3429	1,3429	1,3429	1,3429	0
0,60	1,3406	1,3406	1,3406	1,3406	0
0,40	1,3381	1,3380	1,3381	1,3381	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,20	1,3359	1,3359	1,3359	1,3359	0

Při $\varphi = 1,00$ je koncentrace vzorku 93,4 mg.ml⁻¹.



Obr. 22: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku K "zahuštěný" na koncentraci – typ trendu a regrese lineární



Obr. 23: Graf závislosti indexu lomu n vzorku **K "zahuštěný"** na koncentraci – typ trendu a regrese exponenciální

4.4.9 Vzorek S “zahuštěný”

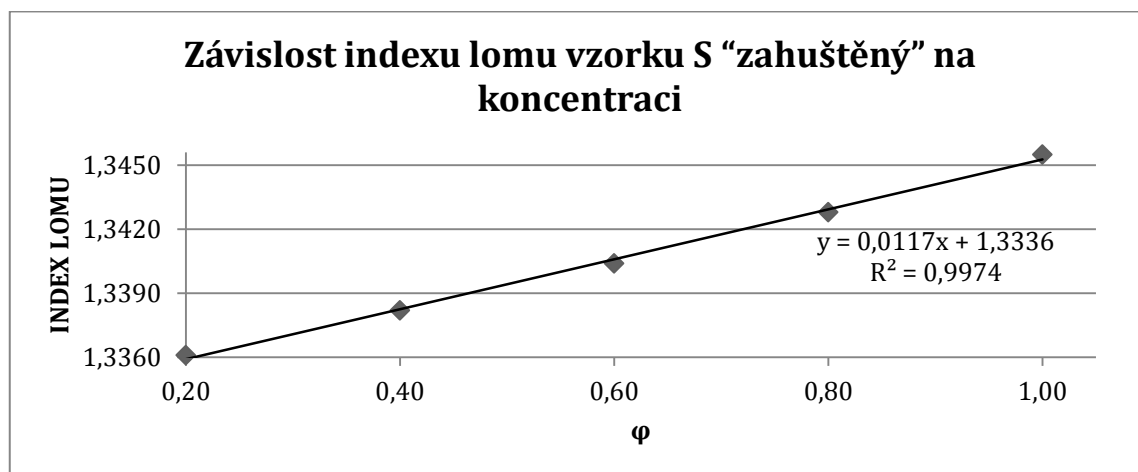
Tab. 13: Biochemická analýza LDL vzorku S

CHOLESTEROL [mmol.l ⁻¹]	TRIACYLGLYCEROLY [mmol.l ⁻¹]	CELKOVÁ BÍLKOVINA [g.l ⁻¹]
5,27	0,55	0,56

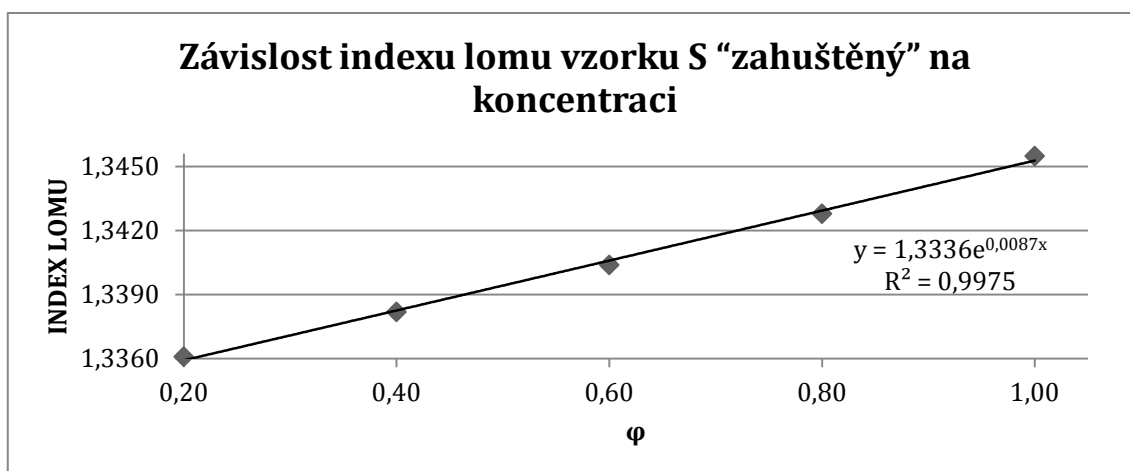
Tab. 14: Indexy lomu vzorku S “zahuštěný”

φ	n_1	n_2	n_3	\tilde{n}	s
1,00	1,3455	1,3454	1,3455	1,3455	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,80	1,3428	1,3428	1,3428	1,3428	0
0,60	1,3404	1,3404	1,3404	1,3404	0
0,40	1,3381	1,3382	1,3382	1,3382	$5,908 \cdot 10^{-5}$
0,20	1,3361	1,3361	1,3361	1,3361	0

Při $\varphi = 1,00$ je koncentrace vzorku $93,6 \text{ mg.ml}^{-1}$.



Obr. 24: Graf závislosti indexu lomu \tilde{n} vzorku S “zahuštěný” na koncentraci – typ trendu a regrese lineární



Obr. 25: Graf závislosti indexu lomu n vzorku S “zahuštěný” na koncentraci – typ trendu a regrese exponenciální

4.4.10 Hodnoty korelačních koeficientů

Tab. 15: Hodnoty korelačních koeficientů R^2 v závislosti na typu a trendu regrese

FUNKCE VZOREK	EXPONENCIÁLNÍ	LINEÁRNÍ	LOGARITMICKÝ	MOCNINNÝ
J "ředěný"	0,9541	0,9542	0,9895	0,9896
B "ředěný"	0,9697	0,9657	0,9998	0,9978
B "zahuštěný"	0,9826	0,9826	0,8971	0,8971
J+B "ředěný"	0,8823	0,8824	0,9205	0,9205
T "ředěný"	0,9000	0,9000	0,8434	0,8434
T "zahuštěný"	0,9586	0,9586	0,8417	0,8417
T-nový "zahuštěný"	0,9995	0,9995	0,9474	0,9477
K "zahuštěný"	0,9996	0,9996	0,9400	0,9405
S "zahuštěný"	0,9975	0,9974	0,9240	0,9246

4.5 Diskuze

Pro stanovení molekulové hmotnosti s využitím LLSD platí následující rovnice:

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{M} \left[1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \langle r_g^2 \rangle \sin^2(\theta/2) + \dots \right] + 2A_2c$$

kde $R(\theta)$ znamená intenzitu světla rozptýleného pod úhlem θ , M vážený průměr molekulové hmotnosti, r_g poloměr rotace, A_2 druhý viriální koeficient (při nízkých koncentracích, obvyklých u kolonové chromatografie, je tato veličina zanedbatelná) a K^* je optický parametr, který je vyjádřen vztahem:

$$K^* = \frac{[4\pi^2 n^2 (dn/dc)^2]}{(\lambda_0^4 N_A)}$$

kde n je index lomu, c koncentrace v mg/ml, λ_0 vlnová délka světla ve vakuu a N_A Avogadrova konstanta.¹⁵

Ze závislostí na obr. 8 – 25 a hodnot korelačních koeficientů v tab. 15 je patrné, že charakter závislosti je pro jednotlivé vzorky individuální. Ve většině případů vyhovuje lineárnímu a exponenciálnímu typu regresní rovnice, u vzorků, které byly naředěny na původní objem plasmy, většinou lépe vyhovuje závislost logaritmická a mocninná. Je tedy zřejmé, že pro každý biologický vzorek bude třeba závislost dn/dc určit individuálně.

4.6 Závěr

Z šesti vzorků lidské krevní plasmy byly po předchozím odstranění frakce VLDL separovány lipoproteiny LDL. Jejich koncentrace byla určena gravimetricky. Závislost indexu lomu na koncentraci byla změřena pomocí refraktometru a příslušné regresní rovnice a korelační koeficienty vypočteny pomocí SW Excel. Z testovaných funkcí vyhovovala u většiny vzorků nejlépe závislost lineární a exponenciální. Vzhledem k odlišným číselným hodnotám koeficientů pro jednotlivé biologické vzorky není závislost dn/dc pro lipoproteiny universální a je třeba ji určit pro každý biologický vzorek individuálně.

Literatura

- ¹ Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: Spektrometrické analytické metody I. Karolinum, Praha 2004
- ² Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: Základní analytická chemie. Karolinum, Praha 2003
- ³ Kalous V. a kolektiv: Metody chemického výzkumu. SNTL – nakladatelství technické literatury, Praha 1987
- ⁴ Zýka J. a kolektiv: Analytická příručka díl II. SNTL – nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- ⁵ Ioffe Boris V.: Refraktometrické metody v chemii. SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1983
- ⁶ Hošek J.: Využití optických metod pro měření vlastností tekutin. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta strojní, 30.7.2012:
http://www.cvut.cz/pracoviste/odbor-rozvoje/stranky/habilitace-a-inaugurace/habilitacni-prednasky/tekutiny_hab_prednaska.pdf
- ⁷ Ferenčík M., Škárka B. a kolektiv: Biochemické laboratorne metódy. Alfa – vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava 1981
- ⁸ Urbánek Daniel: Optické metody se zaměřením na refraktometrii a polarimetrii a jejich využití v chemické analýze. Bakalářská práce, Masarykova Univerzita, Pedagogická fakulta, Brno 2008, 30.7.2012:
http://is.muni.cz/th/185725/pedf_b/BP.pdf
- ⁹ Novák F.: Úvod do klinické biochemie. Karolinum, Praha 2002
- ¹⁰ Čermáková M., Štěpánková I.: Klinická biochemie – 1.díl. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno 2003
- ¹¹ Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: Harperova biochemie, Nakladatelství H+H, Jinočany 2002

- ¹² Tvrzická E.: Chromatografické metody v analýze lipidů v vysokoúčinné analytické separaci biologicky aktivních látek, VŠCHT, Praha 2006, 95 – 105
- ¹³ Čermáková M. a kolektiv autorů, Klinická biochemie – 2.díl. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno 2005
- ¹⁴ Skořepa J. a spolupracovníci: Lipidy a riziko koronární aterosklerózy, Univerzita Karlova, Praha 1980
- ¹⁵ Wen J., Arakawa T., Philo J. S.: Size-Exclusion Chromatography with On-Line Light-Scattering, Absorbance and Refractive Index Detectors for Studying Proteins and Their Interactions. Anal. Biochem. 240, 1996, 155-166
- ¹⁶ Stein Evan A.: Are measurements of LDL Particles ready for Prime Time?. Clin. Chem. 52, 2006, 1643-1644
- ¹⁷ Rizzo M., Berneis K.: Low – density lipoprotein size and cardiovascular risk assesment. Q. J. Med. 99, 2006, 1-14
- ¹⁸ Kamigaki Alisa S., Siscovick David S., Schwartz Stephen M., Psaty Bruce M., Edwards Karen L., Raghunathan Trivellore E., Austin Melissa A.: Low Denstity Lipoprotein Praticle Size and Risk of Early – Onset Myocardial Infarction in Women. Am. J. Epidemiol. 153, 2001, 939-945
- ¹⁹ Mampouya D., Silou T., Kama-Niamayoua R., Makondzo-Mondako C., Kinkela, T.: Refractometric detection of lipids from some vegetables grown in central Africa. Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse 84, 2007, 220-228
- ²⁰ da Silva Karla D.P., Collares Fernanda P., Finzer Jose Roberto D.: A simple and rapid method for estimating the content of solids in industrialized cashew juice. Food Chem. 70, 1999, 247-250

- ²¹ Krauss R. M., Burke D. J.: Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J. Lipid Res.* 23, 1982, 97-104
- ²² Carroll R. M., Rudel L. L.: Lipoprotein separation and low density lipoprotein molecular weight determination using high performance gel-filtration chromatography. *J. Lipid Res.* 24, 1983, 200-207
- ²³ Hirowatari Y., Yoshida H., Kurosawam H., Doumitu K., Tada N.: Measurement of cholesterol of major serum lipoprotein classes by anion-exchange HPLC with perchlorate ion-containing eluent. *J. Lipid Res.* 44, 2003, 1404-1412

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala své školitelce, paní RNDr. Evě Tvrzické, CSc., a konzultantce, paní prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc., za odborné vedení, pomoc, ochotu, cenné rady a připomínky k mé práci a příjemnou spolupráci.

Děkuji svým rodičům a příteli Ing. Janu Žantovi, IWE za veškerou podporu při mém studiu.

Dále bych ráda poděkovala všem, kteří mě v práci podpořili a pomohli.